



Kandidaatintutkielma

# Lipidien peroksidaatio Alzheimerin taudissa

Elizaveta Boiko

Oulun yliopisto  
Biokemian ja molekyyli lääketieteen tiedekunta  
2020

# Sisällysluettelo

## Sisällys

1. Johdanto – Alzheimerin tauti, sen biomarkkerit ja tutkimisen ajankohtaisuus	4
2. HNE	
2.1. Lipidien peroksidaatio	6
2.2. 4-hydroksi-nonenaali, HNE	8
2.3. HNE-aggregaatit ja niiden vaikutus solun toimintaan	9
2.4. HNE-aggregaattien yhteys AD:n biomarkkereihin	12
2.5. Vapaiden rasvahappojen peroksidaation tuotteiden yhteys solukuolemaan	16
3. Kolesterolin	
3.1. APOE-e4 alleeli altistaa AD sairastumiselle	17
3.2. Oksikolesterolien synty	18
3.3. Oksikolesterolien pitoisuudet Alzheimerin taudissa	20
3.4. Oksikolesterolien yhteys AD:n biomarkkereihin	23
3.5. Oksikolesterolien vaikutus soluun	26
4. Mitokondrion toimintahäiriöt lipidien peroksidaation seurauksena ja niiden yhteys solukuolemaan	28
5. Oksidatiiviseen stressiin keskittyvän hoidon tehokkuus ja tulevaisuus	30
6. Lähteet	31

## Käytetyt lyhenteet

AD	Alzheimerin tauti (Alzheimer's disease)
NFT	Hermosäiekimput (neurofibrillary tangles)
APP	Amyloidiprekursoriproteiini (amyloid precursor protein)
HNE	4-hydroksy-nonenaali
OS	Oksidatiivinen stressi (oxidative stress)
ROS	Reaktiivinen happilaji (reactive oxygen species)
MUFA/PUFA	Kerta-/monitydyttymätön rasvahappo
Hsp	Lämpöshokkiproteiini (heat shock protein)
PE	Fosfatidyyli-etanoliamiini (phosphatidyl-ethanolamine)
PI	Fosfatidyyli-inositoli (phosphatidyl-inositol)
PC	Fosfatidyyli-kolini (phosphatidyl-choline)
GEE	Glutathionietyyliesteri (Glutathione ethyl ester)
MIC	Kohtuullinen kognitiivisen funktion häiriö (mild cognitive impairment)
BACE	Beta-sekretaasi 1

# **1. Johdanto - Alzheimerin tauti, sen biomarkkerit ja sen tutkimisen ajankohtaisuus**

Dementia yleistyy populaation ikääntyessä. Nykyään se on kolmanneksi yleisin kuolinsyy korkean tulotason maissa, Suomi mukaan lukien (WHO 2016, Tilastokeskus 2018). Dementiapotilaan muisti huononee jatkuvasti ja vakavimmissa tapauksissa esiintyy myös psykiatrisia oireita.

Alzheimerin tauti (Alzheimer's disease, AD) on yleisin dementiaa aiheuttava sairaus. Sen erikoispiirteisiin kuuluvat amyloidit, eli A $\beta$ 40 ja A $\beta$ 42-peptideistä muodostuvat proteiinikertymät. A $\beta$ -40 ja -42 syntyvät amyloidiprekursoriproteiinin pilkkomisen seurauksena. Toinen tunnettu AD:n biomarkkeri on hermosäiekimppujen (neurofibrillary tangles, NFT) muodostuminen. Kimppuihin kertyy hyperfosforyloitunutta tau-proteiinia (Amemori *et.al.* 2015). Vaikka molemmat biomarkkerit ovat jo pitkään tunnettuja ja niitä aktiivisesti tutkitaan, AD on nykyaikana hoitomaton sairaus, jonka edistymistä voi joskus hidastaa, mutta ei pystytä estämään. Useat yritykset ovat investoineet amyloidien ja hermosäiekimppujen poistamiseen keskittyviin lääkityksiin. Valitettavasti sellaisten lääkitysten tehokkuus on kyseenalaista ja niitä koskevat tilastot tarjoavat hyvin vaihtelevia haitta-hyöty suhteita. Toisin sanoen, amyloidien ja NFT:n poistaminen ei riitä AD:n edistyksen pysähtymiseen, ja maailma tarvitsee uusia keinoja ja uusia lääkityskohteita.

Tästä johtuu kasvava kiinnostus aineenvaihduntamuutoksista, jotka tapahtuvat AD:ssa. Erityinen kiinnostuksen kohde on rasvan aineenvaihdunta. Aivoissa sijaitsee noin 30% koko elimistön kolesterolista, neuronien toiminnan kannalta erityisen tärkeää on lipideistä koostuva myeliinituppi ja solukalvojen tasapainotetulla koostumuksella on merkitystä synapsien toiminnan tehokkuuden kannalta.

AD on aina kytköksissä oksidatiiviseen stressiin (oxidative stress, OS), mikä tarkoittaa reaktiivisten happiradikaalien (reactive oxygen species, ROS) korkeaa pitoisuutta kudoksessa. ROS-molekyylit vuorovaikuttavat biomolekyylien kanssa pelkistyshapetusreaktioiden välityksellä. Biomolekyylien hapettuminen vaikuttaa niiden funktioihin ja rakenteisiin. Tässä kandidaatintutkielmassa päädyin keskittymään lipidien peroksidaatioon.

Lipidiaineenvaihdunnassa tapahtuu merkityksellisiä muutoksia AD:ssa. 8 lipidiryhmää korreloivat AD-diagnoosin kanssa eli niiden pitoisuudet eroavat terveiden ja AD potilaiden aivojen välillä. Tau-kertymien määrä ja aivojen atrofian vakaussaste positiivisesti korreloivat 12 lipidiryhmän kanssa, mukaan lukien asyylikarnitiinit, fosfatidyylikolinit ja keramidit.

Myös tau-kertymillä on positiivista korrelaatiota kertatytyttymättömien rasvahappojen (monounsaturated fatty acids, MUFA) kanssa. MUFA:n aineenvaihdunta on erityisen tärkeää AD:n alkuvaiheessa. Monitydyttymättömien rasvahappojen (polyunsaturated fatty acids, PUFA) aineenvaihduntamuutokset ovat puolestaan korreloituneet myöhäisemmän AD-vaiheen kanssa (Barupal *et.al.* 2019).

Selkäydinnesteessä sijaitsevan A $\beta$ 1-42 peptidin pitoisuudella on positiivinen korrelaatio monitydyttymättömien triasyyliglyseridien ja negatiivinen korrelaatio monitydyttymättömien lysofosfatidyylikolinien kanssa. Amyloideilla on myös negatiivinen korrelaatio keramidien, fosfatidyyliinositolien ja fosfatidyylikolinien kanssa. Edellä mainittujen lipidiryhmien aineenvaihduntamuutokset, tämä koskee erityisesti keramidejä, fosfatidyyliinositolia sekä lysofosfatidyylikolineja, ovat kytköksissä apoptoosiin eli ohjelmoituun solukuolemaan. Havainnot todistavat, että AD-potilaan aivoissa tapahtuu lipidimetabolian muutoksia, mukaan lukien desaturaatio, hiiliaketjun pidentyminen ja asyyliketjun uudelleenrakentuminen (Barupal *et.al.* 2019, Murray *et.al.* 2006). Lysofosfolipidit, joilla on korrelaatiota A $\beta$ 1-42 pitoisuuden kanssa, ovat usein hapetettujen lipoproteiinien rakenneyksiköitä. Negatiivisen korrelaation syynä voi olla se, että useat lysofosfolipidit joutuvat hapetettuihin lipoproteiineihin, joita muodostuu enemmän oksidaation seurauksena, ja vapaiden lysofosfolipidien määrä laskee.

Yllä mainituista lipidiryhmistä kaksi ovat riippuvaisia sekä tau-kertymistä, että amyloideista, -keramidit ja fosfatidyylikolinit (Barupal *et.al.* 2019). Keramidi on yksi tärkeimmistä ja runsaimmista lipidiryhmistä hermokudoksessa, sen takia keramidien oikea pitoisuus on merkityksellistä kudoksen virheettömän toiminnan kannalta. Fosfatidyylikolinien lipidiryhmä on yleisin lipidikaksoiskalvon rakennemateriaali (Murray *et.al.* 2006). Sen takia, että eri biomarkkerit korreloivat keramidien ja fosfatidyylikolinien kanssa eri tavalla: tau-kertymät korreloivat positiivisesti ja amyloidit negatiivisesti, edellä mainitun tutkimuksen tulosten tulkitseminen vaatii lisää tietoa.

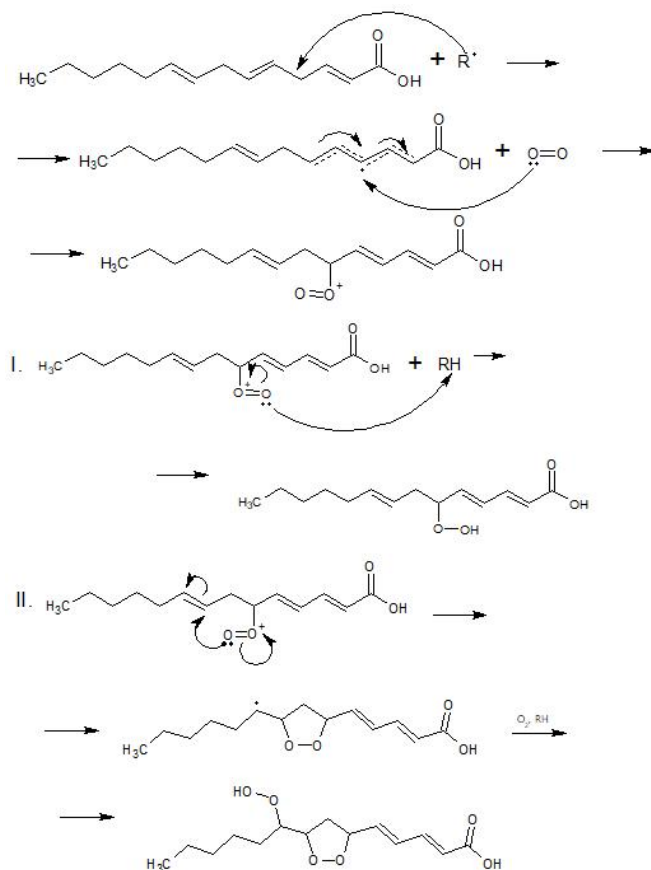
## 2. HNE

### 2.1. Lipidien peroksidaatio

Lipidien peroksidaation mekanismille tunnetaan neljä eri reittiä: entsymaattinen, ei-entsymaattinen, ROS-välitteinen ja ei-entsymaattinen, eikä ROS-välitteinen (Niki *et.al.* 2005). Näistä neljästä reitistä erityisen kiinnostavia tämän kandidaatintutkielman näkökulmasta ovat toinen ja kolmas, koska niiden merkitys kasvaa ikääntymisen ja ikääntyessä merkittävästi pahentuvan OS:n myötä.

PUFA:t ovat kaikista eniten peroksidaatiolle taipuvia lipideja runsaan kaksoissidosmääränsä ansiosta. Tyydyttyneet ja kertatyydyttymättömät rasvahapot altistuvat peroksidaatiolle paljon vähemmän. Toisin sanoen, havaintojen mukaan, mitä suurempi on kaksoissidosten määrä, sitä todennäköisempi on peroksidaatio.

Ensin radikaali hyökkää PUFA:an ja ottaa vastaan yhden vetymolekyylin, jättäen radikaalisen hiiliatomin rasvahappoketjuun. Hiiliradikaali reagoi molekulaarisen hapen kanssa muodostaen lipidiperoksyyli-radikaalin. Peroksyyli-radikaali voi hajota muodostaen taas happea ja hiiliradikaalia, näin rasvahappoketju voi järjestäytyä uudelleen. Tämän reaktion seurauksena happea sitova hiili vaihtelee. Vihdoin, peroksyyliradikaali pelkistyy ja muuttuu lipidihydroperoksidiksi (Kuva 1). Entsyymit voivat edelleen muokata lipidihydroperoksidia. Entsyymeillä tehtyjen muokkauksien ansiosta lipidihydroperoksidista syntyy erilaisia johdannaisia, esimerkiksi 4-hydroxy-nonenaalia (HNE), akroleiinia, malondialdehydia (MDA) ja niin edelleen (Niki *et.al.* 2005).



Kuva 1. Lipidiradikaalin muodostuminen PUFA:sta.

Vapaa radikaali hyökkää rasvahappoon, minkä seurauksena muodostuu hiiliradikaali. Hiiliradikaali reagoi molekulaarisen hapen kanssa muodostaen lipidiperoxyyliradikaalia. Peroxyyliradikaali pelkistyy ja muodostuu lipidihydroperoksidi. Peroxyyliradikaalin reaktiivinen happi voi muodostaa sidoksen hiileen, eikä vetyyn, minkä seurauksena taas syntyy hiiliradikaali. Hiiliradikaali reagoi edellä mainitulla mekanismilla ja peroksyyliradikaali muodostuu toisessa hiiliatomissa. Pelkistymisen seurauksena muodostuu taas lipidihydroperoksidi.

Prasad M.R.-ryhmän (1998) tutkimuksessa kiinnitettiin huomiota kolmeen yleisimpään fosfolipidien ryhmään – fosfatidyyli-etanoliaminit (PE), fosfatidyyli-inositolit (PI) ja fosfatidylkolinit (PC). Kahden jälkimmäisten lipidiryhmien korrelaatio AD:n biomarkkereiden kanssa oli jo mainittu aikaisemmin, kun taas Prasadin tutkimus antaa yksityiskohtaisemman katsauksen fosfolipidien pitoisuuksiin AD-potilaiden aivoissa. Merkitsevä lasku PE:n ja PI:n pitoisuuksissa oli havaittu. Tämä havainto on sopusoinnussa edellä mainitun amyloidin ja PI:n negatiivisen korrelaation kanssa. PC:n pitoisuus ei muuttunut (Barupal *et.al.* 2019, Prasad *et.al.* 1998).

Nämä havainnot tukevat peroksidaatiolähtöistä AD:n edistymisen teoriaa. Juuri PE ja PI usein sisältävät runsaasti hapettumiseen taipuvia monitydyttymättömiä rasvahappoja,

kuten steariinihappoa, öljyhappoa, arakidonihappoa ja dokosaheksaanihappoa. Kuten oli aikaisemmin mainittu, PUFA:t ovat erityisesti herkkiä peroksidaatiolle, mistä voi päätellä, että niitä sisältävien fosfolipidien pitoisuus laskee rasvahappoketjujen peroksidaation seurauksena. PC puolestaan yleensä sisältää huomattavasti vähemmän hapettumiseen taipuvia rasvahappoketjuja, sen takia sen pitoisuus pysyy lähes vakiona AD:n edistyessä (Prasad *et.al.* 1998).

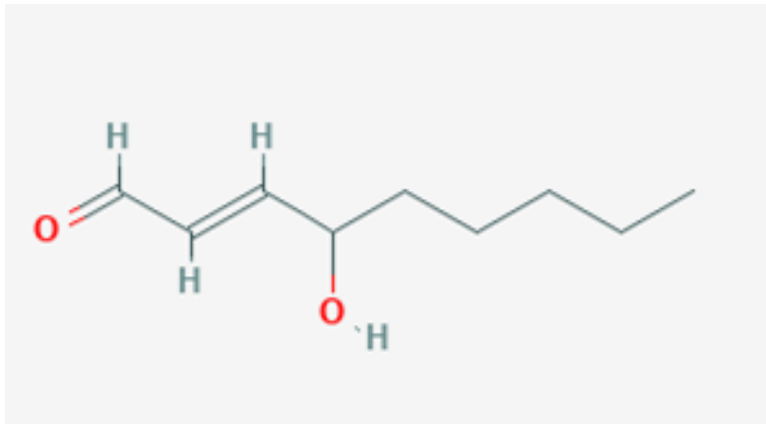
## **2.2. 4-hydroksi-nonenaali, HNE**

4-hydroksi-nonenaali eli HNE on yksi tunnetuimmista lipidiperoksidaation tuotteista. Se kuuluu 4-hydroksi-alkenaalien ryhmään, jonka yleiset piirteet ovat aldehydiryhmä, siihen konjugoitu kaksoissidos sekä hydroksyyli-ryhmä. Hiiliketjun pituus saattaa vaihdella 4-hydroksi-alkenaalien ryhmän sisällä. HNE:n ketjussa on 9 hiiltä (Jin *et.al.* 2013).

HNE:n reaktiivisuus perustuu sen  $\alpha$ ,  $\beta$ -tyydyttymättömien hiilien reaktiivisuuteen eli valmiuteen muodostaa kovalenttisen sidoksen nukleofiiliseen biomolekyyliin. Erityisen hyviä nukleofiilejä HNE:n addiktiolle ovat aminohapot, nimenomaan kysteini, histidiini ja vähäisemmällä affiniteetillä lysiini. HNE:n sitoutuminen häiritsee proteiinien rakennetta ja toiminnallisuutta. Nukleofiilisen addition mekanismi voi olla joko Mikaelin additio tai Shiffin emäs. Addition tuloksena syntynyt kovalenttinen sidos on niin vahva, että se kestää proteolyysiä ja proteiinien analyysimenetelmiä. Muodostuneet aggregaatit voivat edelleen muokkautua ja reagoida keskenään muodostaen stabiileja lipidiperoksidaation lopputuotteita (Sayre *et.al.* 2006).

Useassa tutkimuksessa todistettiin, että sairauksissa, jotka esiintyvät OS:n yhteydessä tai sen seurauksena, muodostuu HNE-proteiini aggregaatteja ja niitä pyrittiin luokittelemaan. Aggregaatteja muodostavien proteiinien luokittelu antaa katsauksen siihen, mitkä prosessit voivat olla häiriintyneinä HNE:n pitoisuuden noususta, koska todennäköisesti HNE-addiktion seurauksena proteiinin toiminnallisuus laskee, jos ei katoa kokonaan.





Kuva 2. 4-hydroksi-nonenaalin rakenne. HNE:n rakenteeseen kuuluvat aldehydiryhmä, konjugoitu kaksoissidos ja hydroksyyli-ryhmä (Pubchem 2020).

### 2.3. HNE-aggregaatit (adducts) ja niiden vaikutus solutoimintaan

AD:ssa pahentuva OS esiintyy myös muissa sairauksissa ja muissa ruumiinosissa. Yksi esimerkki on hepatiitti eli maksatulehdus, jonka edistymisessä ROS:lla on tärkeä rooli.

Guo J. ja hänen ryhmänsä (2011) tutkivat ”karbonyylistressin” vaikutusta hepatosyytteihin eli maksan soluihin. Tutkimuksessa väitettiin, että suurin osa aggregaatteja muodostavista proteiineista liittyi apoptoosiin, kasvaimen morfologiaan ja lääkeaineiden metaboliaan. Myös useat HNE-modifioidut proteiinit ovat kytköksissä energiavaihduntaan, esimerkkinä voi mainita keskeistä oksidatiivisen ketjun kompleksia – ATP syntaasia. Muiden havaintojen ohella erittäin tärkeää on se, että HNE sitoutuu OS:n torjuntaan osallistuviin proteiineihin, esimerkiksi katalaasiin ja glutationi-S-transferasiin.

HNE-aggregaatteihin joutuneista proteiineista valtaosa oli mitokondrioperäisiä (Guo *et.al.* 2011).

Newtonin ryhmä (2009) myös tutki alkoholistiseen rasvamaksatulehdukseen sairastuvien hiirien proteiinien karbonylaatiota. Karbonylaatio on hiiliketjun sitoutuminen biomolekyyliin ja HNE addiktio luokitellaan karbonylaatioksi. Tukien edellä mainittua tutkimusta, ryhmä havainnoi, että kaperonit, antioksidanttiproteiinit sekä aineenvaihduntaproteiinit ovat karbonylaation kohteita. Useat tutkitut proteiinit ovat taas mitokondriaalisia, mikä korostaa sitä, että karbonyylistressillä voi olla negatiivinen vaikutus mitokondrion toimintaan (Newton *et.al.* 2009).

Yllä mainitut tutkimukset käyttivät maksakudosta. Vaikka maksatulehduksen ja AD:n välillä voi olla paljon yhteistä, muun muassa OS ja karbonyylistressi, kudosten välillä voi olla paljonkin eroja. Sen takia, seuraavaksi keskitytään HNE:n aiheuttamiin muutoksiin aivokudoksessa.

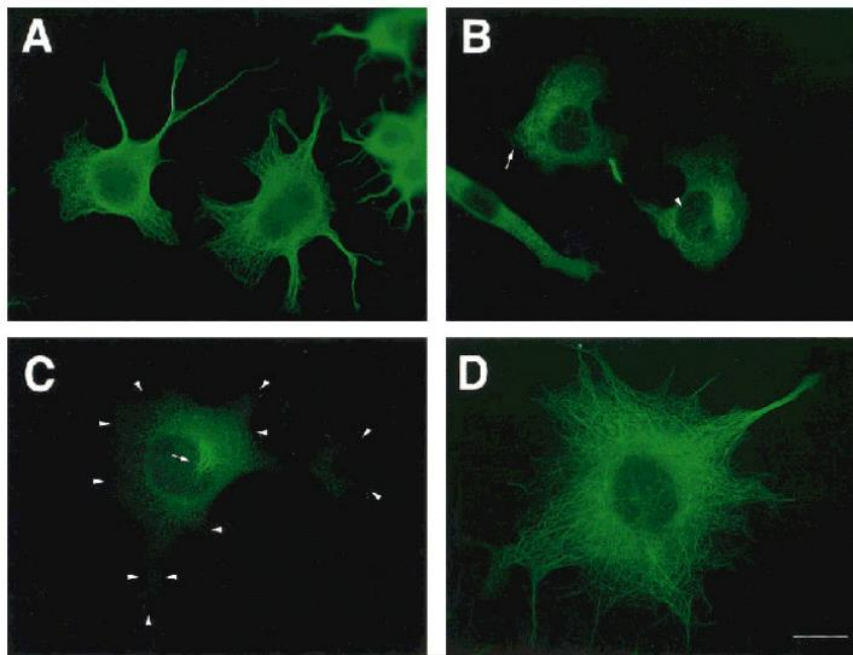
Aivokasvaimista, tarkemmin keskushermoston tukisolukasvaimista, löydettiin paljon HNE-aggregaatteja. HNE-aggregaattien määrä korreloi suoraan kasvaimien pahanlaatuisuuden kanssa. Toisin sanoen, pahanlaatuiset kasvaimet sisälsivät merkittävästi enemmän HNE-aggregaatteja. Niitä löydettiin sekä endoteelisoluista, että verisuonista (Zarkovic *et.al.* 2005). Lievään kognitiiviseen heikentymiseen (mild cognitive impairment, MCI) sairastuvien potilaiden aivoissa valtava määrä proteiineja oli konjugoitu HNE-molekyyleihin. HNE-konjugaattien joukossa olivat mitokondriaaliset proteiinit ja glykolyysiä edistävät entsyymit (Reed *et.al.* 2008). Glykoosi on aivojen tärkein energialähde ja häiriintynyt glukoosiaineenvaihdunta mitokondrioiden vajaatoiminnan kanssa lähettävät solulle apoptoosia käynnistävää signaalia. Tällä mekanismilla voi selittää AD:ssa tapahtuvaa neuronien kuolemaa (Reed *et.al.* 2008).

Karbonyylireduktaasi on entsyymi, joka auttaa torjumaan HNE:n ja muiden karbonyyliyhdisteiden haitallista vaikutusta pelkistämällä niitä, näin estäen biomolekyylien karbonylaatiota. Karbonyylireduktaasi vaurioituu karbonyylistressin olosuhteissa ja voi itse muodostaa aggregaatin HNE:n kanssa. Tästä johtuu positiivisen palautteen sykli eli HNE inhiboi karbonyylireduktaasia, näin estäen karbonyyliaggregaattien poistumista, minkä seurauksena enemmän HNE-aggregaatteja kertyy soluun (Reed *et.al.* 2008).

Havainnoitiin myös HNE:n muodostavan aggregaatteja sytoskeletonin proteiinien kanssa. Aktiini, yksi sytoskeletonin proteiineista, on erityisen tärkeä molekyyli hermosoluissa, joiden rakenteeseen kuuluvat pitkät aksonit. Sytoskeletonin avulla tapahtuu muun muassa välittäjäaineiden kuljetus aksonin päätepäähän ja erikoisen solumuodon ylläpitäminen, sekä hermosolujen elongaation edistäminen. Kun aktiini muodostaa aggregaatin HNE:n kanssa, se ei enää pysty suorittamaan tehtäväänsä, minkä seurauksena hermosolun elongatio katoaa, sen muoto tulee pyöreämmäksi ja solujen kontakti synapsien välityksellä voi hävitä ääritilanteessa (Reed *et.al.* 2008).

Toinen neuronien ulkomuodon ja neuriittien elongaation kannalta tärkeä sytoskeletoniproteiini on mikrotubuliini. Neely M.D työtovereineen (1999) pohdiskeli, että tämä proteiini voi olla HNE-addiktion pääkohde. HNE:llä oli todistettu merkityksellinen negatiivinen vaikutus mikrotubuluksiin. HNE häiritsee mikrotubulusten järjestäytymistä kiinnittämällä niihin Michaelin addiktion mekanismilla. Sen vaikutus on erittäin nopea. Tutkimuksen mukaan negatiivisia muutoksia havainnoitiin jo 15 minuutin inkubaatioajan jälkeen, kun HNE:n pitoisuus ei ollut valtavan korkeaa vaan patologista tilannetta vastaava. Patologisena HNE:n pitoisuutena pidetään 25  $\mu$ M. Havainnoitiin myös sitä, että HNE:n pitoisuuden kasvaessa hermosolujen elongatio vähenee. Vaikka 1 tunnin inkubaation jälkeen solun morfologia säilyy, tilastollisesti merkitsevä solujen ulkokasvun lasku oli havainnoitu patologisessa HNE:n pitoisuudessa pidemmän inkubaatioajan (24h) jälkeen. Tietenkin, HNE:n negatiivinen vaikutus koskee myös mikrotubulusten verkostoa kokonaisuudessaan. Sen tehokkuus on pitoisuusriippuvainen. Toisin sanoen, pienet HNE-pitoisuudet aiheuttavat lähinnä pelkkiä periferiaalisia muutoksia; ja kun pitoisuus on patologinen tai sitä korkeampi HNE johtaa vakavampaan epäjärjestäneisyyteen (Kuva 3). 60 minuutin inkubaatioaika 25  $\mu$ M HNE-pitoisuudella on riittävän tehokas aiheuttamaan vakavan mikrotubulusverkoston epäjärjestäneisyyden lähes kaikissa soluissa (96.3%) (Neely *et.al.* 1999).

Hermosolujen deformaatio ja ulkokasvun vähentäminen todennäköisesti johtavat solusolukontaktien, eli synapsien, menettämiseen. Tämän seurauksena kognitiivinen funktio heikkenee.



Kuva 3. HNE häiritsee mikrotubuluksia. Kuvan lähde: Neely *et.al.* 1999: The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal inhibits neurite outgrowth, disrupts neuronal microtubules, and modifies cellular tubulin © John Wiley and Sons 2020. Kuvan käyttöön on saatu lupa kustantajalta.

Neurologisia 2A soluja oli inkuboitu vaihtelevissa HNE-pitoisuuksissa 1 tunnin ajan, ja mikrotubulusten järjestäneisyyttä oli havainnointu immunofluoresenssilla käyttäen anti- $\beta$ -tubuliini-vastainetta. Kontrollisoluisissa (A), tiheä mikrotubulusverkosto leviää solun keskikohdasta periferiaan. Soluissa, jotka olivat käsitelty 10  $\mu$  HNE:llä (B), perifeeraalisten mikrotubulusten häviö on havainnollista. Mikrotubulusten fragmentit (B, nuolenpää) ja silmukoituneet mikrotubulukset (B, nuoli) ovat nähtävissä. 25  $\mu$ M pitoisuudella HNE aiheuttaa vakavan mikrotubulusverkoston epäjärjestäneisyyden. Poikkeuksena on muutama mikrotubulus perinukleaaritilassa, jotka välillä jäävät (C, nuoli osoittaa jääneitä mikrotubuluksia) Vakavasta mikrotubulusten epäjärjestäneisyydestä huolimatta solu ylläpitää sen morfologian 1 tunnin inkubaatioajan jälkeen (C, nuolet päät osoittavat solun periferiaa). Solujen käsittely 25  $\mu$ M ONA:lla 1 tunnin ajaksi ei vaikuttanut mikrotubulusten järjestäneisyyteen.

#### 2.4. HNE-agregaattien yhteys Alzheimerin taudin biomarkkereihin

Hsp-70 proteiini kuuluu kaperoneihin eli proteiineihin, jotka auttavat proteiinien laskostumista ja purkavat aggregaatteja. Magranén ryhmä (2004) löysi, että Hsp-70 vähentää amyloidien aiheuttamaa toksisuutta aivokudokselle estämällä A $\beta$ -peptidien kertymistä. Reed ja ryhmänsä (2008) tutkimuksessaan löysivät, että Hsp-70 proteiini oli myös HNE:n hyökkäyskohteena. HNE-addiktiosta johtuva lasku Hsp-70 kaperonin aktiivisuudessa kiihdyttää amyloidien kertymistä ja taudin edistymistä.

EF-Tu ja eIF- $\alpha$  ovat myös HNE-addiktio kohteita. Nämä proteiinit ovat tärkeitä proteiinisynteesimekanismin virheettömän toiminnan kannalta ja niiden toiminnan häiritseminen voi lisätä proteiinien virheellistä laskostumista ja aggregaattien, kuten

amyloidien ja NFT:n, määrää kudoksessa. Sekä EF-Tu että eIF- $\alpha$  proteiinin toiminnallisuuden lasku kuormittaa kaperonia, mukaan lukien Hsp-70, erityisesti OS:n tilanteessa (Reed *et.al.* 2008).

Aikaisemmin mainittiin, että terveellisessä solussa tau-proteiini sitoutuu mikrotubuliiniin. Näin, mikrotubulusverkoston epäjärjestäytyminen HNE-käsittelyn seurauksena voi johtaa tau-proteiinin vapauttamiseen. Vapaa tau-proteiini fosforyloituu ja muodostaa NFT:t. Näin HNE epäsuorasti lisää tämän biomarkkerin kertymistä AD-potilaiden avioissa. NFT:n muodostuminen voi puolestaan lisätä Alzheimerin taudin etenemisen vauhtia (Neely *et.al.* 1999). Toisessa tutkimuksessa väitettiin, että HNE-addiktiotuotteet voivat kertyä neurofibrilaaristen säikeiden päälle. Se voi myös vaikuttaa taudin vakauteen, koska NFT-agregaattien purkaminen kaperonien avulla vaikeutuu monimutkaisen ja kookkaan rakenteen ansiosta. Siitä seuraa myös se, että HNE-aggregaatit eivät ole vain OS:n sivumerkki vaan se voi antaa panoksensa AD:ssa ilmestyvään sytoskeletonin epäjärjestyneisyyteen ja taudin vakauteen (Montine *et.al.* 1997).

Johtopäätöksenä voi väittää, että HNE-modifioituja proteiineja AD sairastavien laboratorioeläinten sekä ihmisten aivoissa on enemmän kuin kontrolleissa. HNE:n addiktiokohteet ovat usein solun aineenvaihdunnan, muodon ylläpitämisen ja OS:n torjunnan kannalta tärkeitä proteiineja. Monet solun funktiot häiriintyvät HNE:n vaikutuksesta ja sillä voi olla suuri merkitys AD:n edistymisessä ja vakaudessa (Taulukko1).

Hermosolujen synapseissa, synaptosomeissa, HNE aiheuttaa merkittäviä kalvoproteiinien konformaatiomuutoksia. Seurauksena tapahtuu muutoksia proteiinien vuorovaikutuksessa keskenään ja lipidikaksoiskalvon kanssa. Myös kaksoiskalvon fluiditeetti ja järjestys muuttuvat. Suurin osa näistä muutoksista tapahtuu jo alhaisilla, fysiologisilla HNE:n pitoisuuksilla (Subramaniam *et.al.* 2002). Synaptosomien virheetön toiminta on välttämätöntä solujen signaalien välittämisessä ja siis hermosolujen yhteistoiminnan kannalta. Merkitykselliset muutokset vahingoittavat hermokudoksen toiminnallisuutta.

Vaikka muutamien entsyymien aktiivisuuden lasku MCI-potilaiden aivoissa oli tutkittu Reedin tyhmässä, taulukoiduista proteiineista valtaosan käyttäytyminen HNE-aggregaatissa ei ole tunnettu. Sen takia seuraavaksi annetaan esimerkki sitä, miten lipidien peroksidaatio suoraan liittyy Alzheimerin taudin biomarkkeriin – amyloideihin. HNE kovalenttisesti sitoutuu A $\beta$ -

peptidien histidiineihin. Tästä modifikaatiosta johtuu nostettu A $\beta$ :n affiniteetti kalvolipideihin ja suurempi aggregoitumistaipumus (Murray *et.al.* 2007). Toisin sanoen HNE:n tekemä modifikaatio avustaa A $\beta$ -aggregaattien, eli amyloidien, muodostumista.

Vapaat, ei-aggregaatissa olevat A $\beta$ -peptidit puolestaan avustavat HNE:n muodostumista Cu<sup>2+</sup>-säädetyllä mekanismilla. Cu<sup>2+</sup>-ioneilla on lipidien peroksidaatiota estävä vaikutus, sama kuin on rautaioneilla Fe<sup>3+</sup>. Tämä ominaisuus johtuu siitä, että kyseessä olevilla ioneilla on elektronivajaus. Sen ansiosta ne pystyvät vastaanottamaan ROS-molekyylien ylimääräisen elektronin, joten ROS pelkistyy ilman haittavaikutuksia solulle. A $\beta$ -peptidit sitovat peroksidaatiota estäviä ioneja ja pelkistävät niitä, samalla hapettamalla molekulaarista happea ja tuottamalla vetyperoksidia. Tämän reaktion lopputuloksena solu menettää ROS-molekyyliä pelkistävän ionin ja saa sen sijaan uuden ROS-molekyylin. Näin vapaiden A $\beta$ -peptidien vuorovaikutus kupari-ionien kanssa lisää kaksinkertaisesti OS:n painetta ja edesauttaa biomolekyylien, lipidit mukaan lukien, peroksidaatiota (Huang *et.al.* 1999).

Ei ole todennäköistä, että HNE-konjugoitu  $\alpha\beta$ -peptidi pystyy avustaa ROS tuottoa Cu<sup>2+</sup>-mekanismilla. Se johtuu siitä, että HNE-konjugoidut histidiinisivuryhmät osallistuvat myös metalli-ionien sitomiseen. HNE-konjugoidut A $\beta$ -peptidit toimivat templaattina fibrillimuodostumiseen, kun taas vapaat peptidit avustavat HNE:n tuottoa ja uusien templaattien syntyä (Murray *et.al.* 2007).

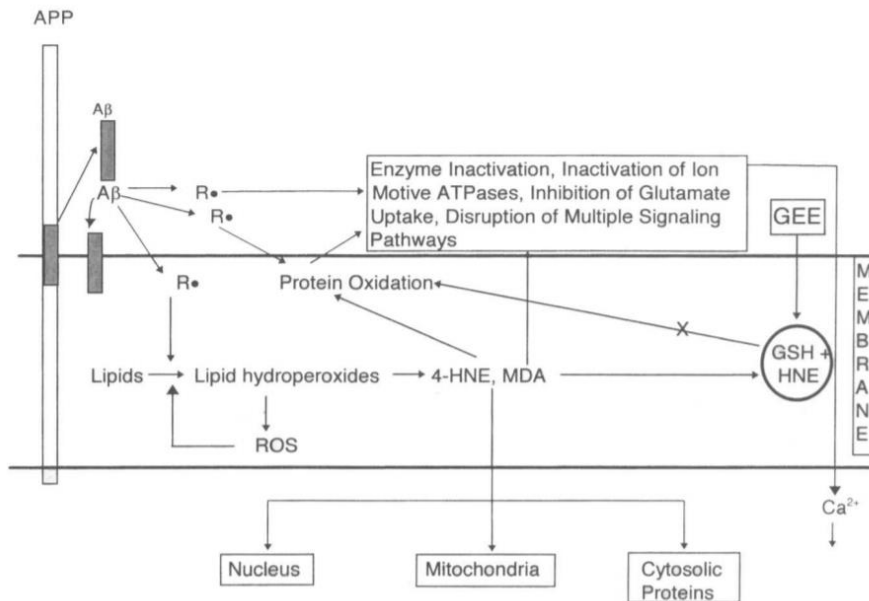
Subramaniamin malli (Subramaniam *et.al.* 2002, Kuva 4) kuvaa hyvin, miten APP epäsuorasti eli vapaiden radikaalien välityksellä avustaa HNE:n ja muiden lipidiperoksidaation tuotteiden syntyä. Mutta on olemassa todisteitä siitäkin, että A $\beta$ -peptidillä on suoraa, ei ROS-välitteistä, vaikutusta lipidien peroksidaatioon. Butterfield työtovereineen (Butterfield *et.al.* 1994) keskittyi tutkimuksessaan APP:n 25 – 35 peptidifragmenttiin, jolla todistettiin korkeaa neurotoksisuutta ja joka voi muodostua spontaanisti. Tämä fragmentti kuuluu sekä A $\beta$ -40, että A $\beta$ -42 rakenteeseen. Se tuottaa proteiini- ja happiradikaaleja minuuteissa. Kuitenkin on huomioitava, että amyloidin rakenteessa tämän fragmentin neurotoksisuus laskee, ja radikaalien tuotto voi kestää tunteja ja jopa päiviä. Tutkimuksessa seurattiin synaptosomien solukalvojen reaktiota yllä mainitun peptidin käsittelylle. Tulosten perusteella Butterfield väitti, että todennäköisesti tämä peptidifragmentti suoraan käynnistää, proteiinien hapettumisen ja radikaalien muodostumisen lisäksi, lipidien peroksidaatiota. Tätä johtopäätöstä tukee se, että A $\beta$ 25-35 käsittelyn jälkeen havainnoitiin muutoksia lipidikaksoiskalvon sisällä, mihin

rasvahappoketjut ulottuvat, eikä sen ulkoisella lipidivesirajalla, missä radikaalimolekyylit pystyvät hyökkäämään lipidejä. Tämä havainto tukee ajatusta, että APP:n fragmentti on välittömässä vuorovaikutuksessa lipidien kanssa ja toimii katalyyttinä lipidien peroksidaatiossa. (Butterfield *et.al.* 1994).

**Taulukko 1. HNE-aggregaatteja hermokudoksessa muodostuvat proteiinit (Neely *et.al.* 1999, Reed *et.al.* 2008 ja Peluigi *et.al.* 2009 tutkimusten perusteella)**

Reedin ja Neelyn ryhmät käyttivät tutkimuksessaan MCI- ja AD-potilaiden aivoja. Peluigi työtovereineen tutkii HNE-aggregaatteja neuroblastoma-solulinjalla. HNE-aggregaatit muodostivat biomolekyylien aineenvaihdunnan, proteiinisynteesin, sytoskeletonin ja oksidatiivisen sekä karbonyylitressin toipumisen kannalta tärkeät proteiinit.

Proteiini	Tehtävä
Neuropolypeptidi h3	Hapetuspelkistysreaktiot ja signaalireitit solukasvussa ja kypsytyksessä (Schoentgen & Jollés 1995) Tärkeä koliniasetyylitransferaasin toiminnan säätelyn kannalta, mikä on tärkeä signaalitransduktiolle ja solu-solu kommunikaatiolle
Karbonyylireduktaasi 1	Karbonyyliyhdisteiden pelkistäminen alkoholeihin HNE-addiktion vastustaminen
Laktaatti dehydrogenaasi	<b>Glukoneogeneesi</b> , elintärkeä aivojen energianvaihdunnalle
Fosfoglyseraattikinaasi	<b>Glykolyysi</b>
HSP 70	<b>Aggregaattien purkaminen</b> , proteiinien laskostuminen ja väärinlaskostuneiden proteiinien ohjaaminen proteosomiin hajottamista varten
ATP-syntaasi	<b>Energia-aineenvaihdunta</b> , oksidatiivinen fosforylaatio
$\alpha$ -enolaasi	Aminohappo-aineenvaihdunta, glykolyysi
$\beta$ -aktiini	Sytoskeletoni
Pyruvaattikinaasi	<b>Glykolyysi</b>
eIF- $\alpha$ (initiation factor alpha)	<b>Proteiinisynteesi</b> , soluproliferaatio
EF-Tu (elongation factor Tu)	<b>Proteiinisynteesi</b>
Mikrotubuliini	Sytoskeletoni
Akonitaasi	<b>Energia-aineenvaihdunta</b>
Aldolaasi	<b>Energia-aineenvaihdunta</b>
MnSOD	ROS:ien poistaminen
Peroksiredoksiini	ROS:ien poistaminen
Glutamiinisyntaasi	Aminohappo-aineenvaihdunta
Dihydropyrimidinaasi	Nukleotidi-aineenvaihdunta



Kuva 4. Malli näyttää miten A $\beta$ -peptidi avustaa vapaiden radikaalien syntyä, näin johtaen lipidiperoksidaatioon, HNE-muodostumiseen ja myös suoraan proteiinien oksidaatioon. Mallissa näkyy myös, että lipidiperoksidaation tuotteet pystyvät itsenäisesti vaikuttamaan tumaan, mitokondriaan ja soliliman proteiineihin. Tutkimuksen mukaan HNE:n haitallista vaikutusta proteiineihin on mahdollista estää glutationietyyliesterillä (GEE). Kuvan lähde: Subramaniam *et.al.* 2002. The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-trans-nonenal alters the conformation of cortical synaptosomal membrane proteins © John Wiley and Sons 2020. Kuvan käyttöön on saatu lupa kustantajalta.

## 2.5. Vapaiden rasvahappojen oksidaatiotuotteiden yhteys solukuolemaan

HNE:n käsittelyn aiheuttama solujen alttius kuolemalle oli todistettu kokeellisesti neurologisen PC12 solulinjan esimerkillä. HNE käynnistää apoptoosia soluissa inhiboimalla anti-apoptoottisten tekijöiden synteesiä ja lisäämällä apoptoottisten tekijöiden pitoisuutta, mukaan lukien kaspasi3 ja Bax. HNE:n vaikutus on nopea, lyhytaikainen käsittely riittää, että saadaan merkittävä osuus kuolleita soluja (Siddiqui *et.al.* 2012).

Eräs solukuoleman regulaattori on p53-proteiini, joka käynnistää apoptoosia ja estää solunkasvua. Cenini työtovereineen (2008) tutkimuksessaan todistivat, että AD aivoissa p53-proteiinin taso oli kohonnut kontroleihin verrattuna. p53:n korkea pitoisuus tarkoittaa sitä, että neuronien kuolema tapahtuu todennäköisemmin, ja suuret solumäärät kuolevat apoptoosin kautta. Tämän seurauksena hermoston rappeutumatauti edistyy nopeammin. Sen lisäksi havainnoitiin, että itse p53 oli modifioitu HNE-konjugaatiolla. Tässä tutkimuksessa



kohderyhmänä olivat kohtuulliseen kognitiivisen funktion häiriöön (mild cognitive impairment, MCI) ja varhaiseen AD:hen sairastuvat potilaat. Havaintojen mukaan p53:n pitoisuudella on merkitystä jo taudin varhaisessa vaiheessa. AD-potilaiden aivojen päälakilohkon alaliuska eroaa MIC potilaista HNE-aggregaattien pitoisuudella. AD-potilaiden aivoissa on enemmän p53-HNE-aggregaatteja kuin MIC aivoissa. Mahdollisesti se johtuu molempien aineiden eli p53:n ja HNE:n kohonneesta pitoisuudesta AD:ssa tai muista additiota tukevista tekijöistä (Cenini *et.al.* 2008). HNE:llä voi olla positiivista korrelaatiota p53:n aktiivisuuden kanssa AD:ssa, koska se on aina edistynyt sairaus, jossa sekä HNE:n pitoisuus, että p53:n aktiivisuus kasvavat jatkuvasti. MCI, jossa HNE-p53-aggregaatteja ei ollut havainnoitu, puolestaan voi olla edistymättä ja sen aiheuttamat muutokset eivät ole niin laajoja AD:hen verrattuna.

Toinen lipidiperoksidaation tuote, akroleiini, deaktivoi HNE:n kanssa SSAD-entsyymiä (succinic semialdehyde dehydrogenase), joka osallistuu glutamaatin aineenvaihduntaan. Tämä inaktivaatio on irreversiibeli, minkä ansiosta se on erittäin tehokasta. SSAD:n avulla solu voi käyttää glutamaattia energia-aineenvaihduntaan ääritilanteessa muokkaamalla SSA (succinic semialdehyde) sukkinatiksi. Aivoissa tällä entsyymillä voi olla toinen, tärkeämpi rooli. SSAD osallistuu GABA-välittäjäaineen takaisinottoon muokkaamalla GABA:a SSA:ksi. Häiriintyneellä SSAD:n toiminnalla on mahdollisesti yhteyttä GABA:n häiriintyneeseen takaisinottoon, mistä seuraavat aivojen biokemian haitalliset muutokset (Nguyen & Picklo 2003).

### **3. Kolesterol**

#### **3.1. APOE-e4 alleeli altistaa AD sairastumiselle**

Tiedetään, että AD:n riski nousee merkittävästi *apoE*-geenin apoE-e4 (APOE4) alleelin omistajilla. APOE4 alleelin kantajilla A $\beta$ -kertymiä löytyy ennen kuin muita oireita, kuten esimerkiksi kognitiivisen toiminnan vaurioitumista, pystytään havainnoimaan. Kertymien määrä on myös merkittävästi suurempi kuin muiden alleelien kantajilla. Myös APOE4-alleellin kantajat ovat iältään nuorempia, kun heillä muodostuu kertymiä, muiden alleelien kantajiin verrattuna (Jansen *et.al.* 2015).

Aivojen lipoproteiinia APOE tuotetaan astrosyyteissä ja eritetään ekstrasellulaariseen tilaan, missä se toimii tärkeimpänä kolesterolikuljettajana (Kim *et.al.* 2009) *APOE4*-alleelin kantajilla on heikentynyt A $\beta$ -kertymien poistumismekanismi mikroglia-kaltaisten (microglia-like) solujen suorittamalla fagosytoosilla. Samalla astrosyyttien kyky vastaanottaa A $\beta$ -42-peptidiä sisäänsä heikkenee. Myös APOE4 neuronit erittävät enemmän A $\beta$ 42-peptidiä. Näiden kolmen tekijän seurauksena kertymiä muodostuu jatkuvasti enemmän.

APOE:ta tuottaviin astrosyytteihin kertyy myös ylimääräistä kolesterolia. Sen lisäksi kolesterolin pitoisuus ekstrasellulaaritilassa astrosyyttien ympärillä *APOE4*-alleelin kantajilla on muihin verrattuna korkeampi (Lin *et.al.* 2018).

APOE3 alleli auttaa merkittävästi vähentämään patalogisia APOE4-alleeliille tyyppisiä AD:lle altistuvia vaikutuksia. Toisin sanoen, heterotsygoottisella yksilöllä havainnoidaan vähemmän APOE4-fenotyypin kaltaisia patalogisia muutoksia.

Sekä glukoosiaineenvaihdunta, että lipidiaineenvaihdunta ja erityisesti kolesterolin metabolia riippuvat toisistaan ja ovat tärkeitä tekijöitä tautien etenemisessä. Esimerkkinä voi olla yksi glukoosiaineenvaihduntaan vaikuttava sairaus - diabetes. Diabeetikoilla on suurempi AD:n ja muiden dementiatyyppien riski. Jos yksilöllä on sekä diabetes, että *APOE4* alleeli, riski nousee vielä enemmän (Peila *et.al.* 2002).

Hyperkolesterolemia tarkoittaa nostettua kolesterolin määrää ja se on syy tai taustatekijä monissa taudeissa, AD mukaan lukien. Hyperkolesterolemia, samoin kuin edellisessä esimerkissä diabetes, laajasti vaikuttaa aineenvaihduntaan ja glukoosimetaboliaan. Sen lisäksi hyperkolesterolemian yhteydessä oksisterolien pitoisuus kasvaa. Toisin sanoen, kun kolesterolia kertyy enemmän, sen oksidaatio myös tapahtuu useammin. Tutkimuksessa tämä todistettiin ruokkimalla kolesterolirunsasta ravintoa rotille ja mittaamalla sen jälkeen rottien aivojen oksikolesterolien pitoisuuksia. Hyperkolesterolemia-tilassa olevien rottien oksikolesterolien pitoisuudet aivoissa olivat merkittävästi koholla. Ainona poikkeuksena oli 24-OH-oksisteroli (Liu *et.al.* 2018).

### **3.2. Oksikolesterolien synty**

Solussa OS:n seurauksena tapahtuva hapettuminen kohdistuu vapaiden rasvahappojen lisäksi kolesteroliin. Aivot sisältävät noin 23% koko elimistön sterolista (Barupal<sup>4</sup>), mistä johtuu myös vastustamaton yhteys kolesteroliaineenvaihdunnan toiminnan ja aivojen terveyden

välillä. Kolesterolin hapettamisen keinoja on kaksi: entsyymaattinen, joka tuottaa vähän oksisterolilajeja, ja ei-entsyymaattinen, joka on usein autohapettumisreaktio ja jonka tuotteet vaihtelevat laajasti (Testa *et.al.* 2016). Kolesterolin hapettumista terveessä elimistössä kontrolloidaan ja siitä on jopa hyötyä elimistölle, koska se estää kolesterolin kertymistä. Hapettuneet kolesterolituotteet lähtevät pois aivoista veriaivoesteen läpi ja niiden metabolia jatkuu muualla elimistössä (Björkhem *et.al* 2009). Ei-entsyymaattinen modifikaatio tapahtuu useammin, jos solutilanne edellyttää sitä.

Esimerkiksi *heme oksygenaasi-1* (heme oxygenase, HO-1) geeni aktivoituu, kun solua stimuloi jokin vaarallinen tai myrkyllinen signaali. Tällaisen signaalimolekyylin roolissa AD:n tapauksessa voi olla ROS tai  $\beta$ -amyloidi. Oksygenaasi toimii mitokondriossa ja sen tehtävä on toipuminen hemin toksisesta vaikutuksesta. HO-1 hajottaa hemia biliverdiiniksi, rautaioniksi ja hiilimonoksidiksi. Vaikka entsyymi auttaa solua poistamaan yhden vaarallisen yhdisteen, sen katalysoiman reaktion tuotteet - rauta ja hiilimonoksidi lisäävät intrasellulaarista vahinkoa edesauttamalla ROS:ien tuottoa. ROS:ien pitoisuuden nousu puolestaan lisää kolesterolin ei-entsyymaattisen hapettumisen todennäköisyyttä. Rottien astrosyyttisolujen transfektio HO-1 cDNA:lla on aiheuttanut tilastollisesti merkitsevää nousua ainakin neljän oksisterolityyppien pitoisuuksissa, ja samalla vapaan kolesterolin pitoisuuden lähinnä puoliintumista, 40% pitoisuuden laskua. Samalla tutkittiin mitokondrion redox-tilaa ja huomattiin, että kun solu on HO-1 transfektoitu, astrosyyteillä on korkeampi taipumus hapettaa oksidaatiomarkkereita LT ja LTG. Molempien markkereiden oksidaatio kohdistui rasvahappoketjuun. Se tarkoittaa, että vapaiden rasvahappojen hapettaminen HO-1 ylimääräisen aktiivisuuden tilassa on hyvin todennäköistä ja tuottaa edellä mainittuja rasvahappojen oksidaatiotuotteita, kuten HNE ja akroleiini. *HO-1*-geenin transfektio ei vaikuttanut lähes ollenkaan ekstrasellularisiin oksisterolien ja kolesterolin pitoisuuksiin (Vaya *et.al.* 2007).

*HO-1*-geenin aktivaatio on vain yksi esimerkki tilanteesta, jossa solutilanne tukee oksisterolien pitoisuuden kasvua. AD:n diagnosointia voi edeltää tilanne, joka aiheuttaisi oksikolesterolien pitoisuuden nousua ja käynnistäisi AD:n edistämistä. AD:n yhteyttä oksikolesterolieihin käsitellään seuraavaksi.

### 3.3. Oksikolesterolien pitoisuudet Alzheimerin taudissa

AD potilaan aivoissa tulehdustekijöiden, esimerkiksi metalloproteaasi-9, pitoisuus kasvaa ja tulehdusta estävien tekijöiden, esimerkiksi sirtuini-1, pitoisuus pienenee. Tulehdustilassa kolesterolin hapettumista tapahtuu normaalia enemmän ja aivoille haitallinen algoritmi käynnistyy (Testa *et.al.* 2016). Toinen tekijä, mikä voi nostaa oksisterolien määrää AD aivoissa, on veriaivoesteen vajaatoiminta. Se voi päästää oksisterolia (tai kolesterolia) verestä aivoihin johtaen hyperkolesterolemiaan aivokudoksessa. Esimerkiksi Brooks tutkimuksessa (2017) yhteys korkean kolesterolitason ja erään oksikolesterolin, 27-OH, kohotetun tason välillä oli todistettu. Todennäköisemmin veriaivoeste estää oksisterolien pääsyä verenkiertoon aivoista. Tutkimusten mukaan oksisterolien pitoisuus kasvaa, kun AD edistyy, ja tämä koskee sekä entsymaattisen, että ei-entsymaattisen hapettumisen tuotteita (Testa *et.al.* 2016).

Yksi poikkeus on entsymaattisesti hapetettu 24-OH-kolesteroli (Liu *et.al.* 2018, Testa *et.al.* 2016). Sen määrä pysyy lähes muuttumattomana AD:n varhaisessa vaiheessa, mutta se oli yllättävästi kontrollia pienempi, kun AD on vakava (Testa *et.al.* 2016). Mielenkiintoista on se, että juuri 24-OH-kolesteroli on tärkein oksisteroli aivoista verenkiertoon kolesterolin kuljetuksen kannalta. Toinen yleisin entsymaattinen oksisteroli, 27-OH-kolesteroli, päinvastoin valtaosin siirtyy aivoihin verenkierrosta (Björkhem *et.al.* 2009).

Jos tutkimus suoritetaan ilman tulosten korvaamista AD-vakauteen suhteessa eli jos kaikkien AD potilaiden aivot yhdistetään samaan ryhmään ja vertaillaan kontrolleihin, vain 24-OH-kolesterolin pitoisuusmuutos on tilastollisesti merkitsevä. 24-OH-kolesterolin määrä laskee dramaattisesti myöhäisessä AD:ssa sekä terveisiin, että varhaisen AD:n potilaiden aivoihin verrattuna. Aivoista kolesterolia pois vievän oksisterolin pitoisuuden lasku voi vahingoittaa aivoja ja edesauttaa taudin etenemistä lisäämällä sekä kolesterolin, että oksisterolien kertymistä aivokudoksessa (Testa *et.al.* 2016).

Monien muiden oksikolesterolien pitoisuus eroaa merkittävästi kontrolleista vasta myöhäisessä AD:ssa (late AD) ja ero ei ole niin suuri, kuin 24-OH-kolesterolin tapauksessa. Tämän seurauksena jotkut saadut tulokset tulevat merkityksettömiksi, jos kaikkien AD-potilaiden aivot yhdistetään samaan ryhmään. Kutenkin, jos oksisterolien pitoisuutta verrataan myöhäisen AD:n aivojen ja kontrollien välillä, havainnoidaan, että se kasvaa taudin edistymisen mukaisesti. Nämä oksisterolit ovat sekä entsymaattisesti, että ei-entsymaattisesti syntesoituja (Taulukko 2).

Kahden oksisterolien pitoisuudet ovat merkittävästi kohonneet jo varhaisessa AD:ssa. Toinen niistä on ei-entsymaattisesti syntesoitu,  $7\beta$ -OH, ja se korostaa OS:n merkitystä taudin alkuvaiheessa, koska ei-entsymaattinen oksidaatio tapahtuu suurissa määrissä oksidatiivisen ympäristön seurauksena. Toinen näistä oksisteroleista on  $7\alpha$ -OH, joka voi syntyä sekä ensymaattisen reaktion, että ei-entsymaattisen hapettumisen seurauksena (Testa *et.al.* 2016).

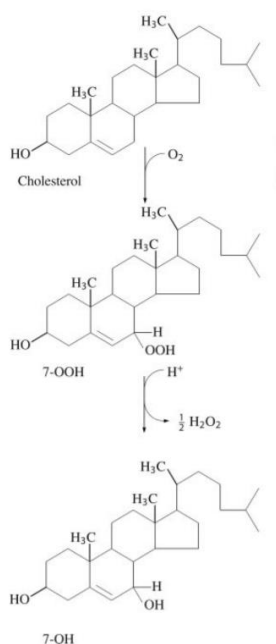
Heverinin ryhmä (2004) myös mittasi oksikolesterolien määrää AD potilaiden aivoissa ja pyrki määrittelemään ne aivojen osat, joissa muutokset ovat kaikista merkityksellisimpiä. Tutkimuksessa havainnoitiin laskenutta 24-OH-oksisterolin pitoisuutta kaikissa tutkituissa aivojen osissa eli etuaivokuoressa, takaraivo-aivokuoressa, basaalganglioissa ja aivosillassa. Kuitenkin tilastollisesti merkitsevä ero oli vain takaraivo-aivokuoressa. Tässä tutkimuksessa, päinvastoin, merkityksellisempi oli 27-OH-kolesterolin pitoisuuden nousu. Se oli tilastollisesti merkitsevä lähes kaikissa aivo-osissa, ainoana poikkeuksena oli aivosilta. Mahdollisesti syynä suureen 27-OH-pitoisuuteen on se, että kaikki potilaat, joiden aivoja käytettiin tutkimuksessa, olivat jo myöhäisessä taudin vaiheessa. 27-OH-oksikolesterolin suhde 24-OH-kolesteroliin oli merkittävästi suurempi kaikissa aivojen alueissa sekä ihmisten aivoissa, että tutkimuksessa käytettyjen hiirien (Swedish Alzheimer mutation mice) aivoissa.

Samassa tutkimuksessa ei ollut löydetty korrelaatiota oksisterolien määrän ja oksisterolia tuottavien entsyymien välillä. Tästä johdettiin, että muutokset ovat fluksimuutosten seurauksia (Heverin *et.al.* 2004). Syynä siihen, että tässä tutkimuksessa ei ollut löydetty korrelaatiota entsyymien ja oksikolesterolitason välillä voi olla pieni näytemäärä. Tämän lisäksi tutkimuksessa mainittiin, että Western blotin sijaan voisi käyttää toista menetelmää saadakseen realistisimpia tuloksia.

<b>Taulukko 2. Oksisterolien pitoisuusmuutokset AD:ssa (Testa <i>et.al.</i> 2016)</b>			
Lähes kaikkien oksisterolien pitoisuudet ovat suurempi AD-aivoissa kontrolleihin verrattuna. Ainoa poikkeus on 24-OH-kolesteroli. Varhaisessa AD:ssa tilastollisesti merkitsevä ero terveiden ja AD-aivojen välillä oli havainnointu vain 7 $\beta$ -OH- ja 7 $\alpha$ -OH-kolesterolin tapauksessa.			
<b>Oksisterolin nimi</b>	<b>Alkuperä</b>	<b>Muutos</b>	<b>Merkitys varhaisessa AD:ssa</b>
24-OH	Entsytomaattinen	↓	Ei tilastollisesti merkityksellistä
27-OH	Entsytomaattinen	↑	Ei tilastollisesti merkityksellistä
7-K	Ei-entsytomaattinen	↑	Ei tilastollisesti merkityksellistä
4 $\alpha$ -OH	Ei-entsytomaattinen	↑	Ei tilastollisesti merkityksellistä
<b>7<math>\beta</math>-OH</b>	<b>Ei-entsytomaattinen</b>	↑	<b>Tilastollisesti merkityksellistä</b>
$\alpha$ -epoxy	Ei-entsytomaattinen	↑	Ei tilastollisesti merkityksellistä
$\beta$ -epoxy	Ei-entsytomaattinen	↑	Ei tilastollisesti merkityksellistä
25-OH	Sekä entsytomaattinen, että ei-entsytomaattinen	↑	Ei tilastollisesti merkityksellistä
<b>7<math>\alpha</math>-OH</b>	<b>Sekä entsytomaattinen, että ei-entsytomaattinen</b>	↑	<b>Tilastollisesti merkityksen</b>

Edellä mainitussa Testan ryhmän (2016) tutkimuksessa, joka oli tehty Heverinin ryhmän (2004) tutkimusta myöhemmin, käytettiin RT-PCR menetelmää määrittämään entsyymien mRNA:n pitoisuuksia. Näin löydettiin, että kahden tärkeimmän entsytomaattisesti hapettuneita oksisteroleita tuottavien entsyymien mRNA-pitoisuudet AD aivoissa poikkeavat huomattavasti terveistä yksilöistä. 27-OH kolesterolia tuottavan CYP27A1 mRNA-pitoisuus on korkeampi AD:ssa kuin terveissä aivoissa, mikä on sopusoinnussa tämän oksisterolin kohonneen pitoisuuden kanssa. Kuitenkin taas merkityksellisin löytö koskee 24-OH kolesterolin tuotantoa ja siihen liittyvää entsyymiä - CYP46A1. Tämän entsyymin mRNA:n määrä laskee huomattavasti, -40%, jo varhaisessa AD:ssa ja häviää lähes kokonaan, 80% lasku, vakavassa AD:ssa, kun vertaillaan terveisiin aivoihin (Testa *et.al.* 2016).

Yhdistämällä tuloksia voi olettaa, että 27OH/24OH-kolesteroli suhde kasvaa sekä fluksimuutosten, että entsyymipitoisuuksien muutosten seurauksena.



Kuva 5. Oksikolesterolin (7-OH-kolesteroli) synteesi. Kolesterolin ensin reagoi molekulaarisen hapen kanssa ja sitten pelkistyy muodostaen oksikolesterolia. Sen lisäksi reaktiossa syntyy vetyperoksidia suhteessa 1:2. Kuvan lähde: Nelson & Alkon 2005. Oxidation of cholesterol by amyloid precursor protein and  $\beta$ -amyloid peptide. © JBC

### 3.4. Oksikolesterolien yhteys AD:n biomarkkereihin

Lipidien peroksidaation yhteydessä oli mainittu yksi amyloidipeptidien toksisista ominaisuuksista – lipidien hapettaminen  $Cu^{2+}$ -mekanismilla. Amyloidipeptidi pystyy hapettamaan kolesterolia samalla mekanismilla vapauttaen hapettunutta kolesterolia ja vetyperoksidia. Reaktio tapahtuu selektiivisesti kolesterolin C-3 hydroksyyli ryhmän kohdalla, minkä seurauksena se muistuttaa kolesterolin entsyymaattista oksidaatiota ja tuottaa 4-kolesten-3-onia.  $A\beta$ -toksisuutta onnistuneesti vähennettiin keloimalla kupari-ioneja, samalla neuronien kuolema väheni.  $A\beta$ -toksisuus korreloi oksisteroleja tuottavan aktiivisuuden kanssa. Sitä johtuen voi olettaa, että 4-kolesten-3-onilla on haitallinen vaikutus soluihin. Kuparin kelatoituminen hiirillä on vähentänyt ei vain 4-kolesten-3-onin määrää, mutta myös  $A\beta$ :n määrää. Tästä voi päätellä, että kolesterolin hapettuminen ja  $A\beta$ -kertyminen muodostuminen ovat toisiaan avustavia prosesseja (Puglielli *et.al.* 2005).

Merkityksellinen 4-kolesten-3-onin pitoisuuden nousu havainnoitiin AD-potilailla. 4-kolesten-3-onia oli 98% enemmän AD-aivoissa kuin terveellä iältään korjatulla ryhmällä. Usein AD tutkitaan Parkinsonin taudin (Parkinson's disease, PD) ohella, ja tässä on hyvää mainita, että

PD potilaiden 4-kolesten-3-onin pitoisuus oli keskimäärin sama kuin terveillä iällä korjatulla kontrollilla. Tästä johtuu, että  $A\beta:Cu^{2+}$  kompleksin suorittama kolesterolin hapettaminen on erikoinen AD:n ominaisuus. Tutkimuksen mukaan  $A\beta$ -peptidin pituudella on merkitystä sen tehokkuuteen. Aikaisemmin mainittiin vain, että vapaa peptidi on kertymään joutuvaa peptidiä tehokkaampaa (Butterfield *et.al.* 1994). Uudemmassa tutkimuksessa havainnoitiin, että  $A\beta$ -peptidi on stabiilimpi ja siis tehokkaampi, jos sillä oli pidempi hiiliketju. Jos vertaillaan yleisimpiä  $A\beta$  peptidejä,  $A\beta$ -42 on tehokkaampi kuin  $A\beta$ -40 (Puglielli *et.al.* 2005).

Sekä APP että amyloidit pystyvät hapettamaan kolesterolia. Eräs hapettumisen tuote on  $7\beta$ -hydroksikolesteroli ( $7\beta$ -OH). Nelsonin ja Alkonin tutkimuksessa (2005) todistettiin, että  $\beta$ -amyloidi ainakin osittain vaikuttaa katalyyttinä  $7\beta$ -OH synteesissä (Kuva 5), koska pelkästään vetyperoksidia sisältävässä ympäristössä oksikolesterolien määrä ei kasva läheskään niin nopeasti. Tästä johtuu, että kolesterolin oksidaatio  $\beta$ -amyloidilla useammin tapahtuu amyloidin läsnäollessa, eikä ole ROS-välitteistä. Kolesterolin oksidaatio amyloidilla on paljon tehokkaampi kuin APP:lla ja se on erityisen tehokasta, jos  $Cu^{2+}$ -ioneja on läsnä. Amyloidien suorittaman hapettumisen reaktionopeus on niin suuri, että se vastaa kolesterolia muokkaavien entsyymireaktioiden nopeutta (Nelson & Alkon 2005).

$A\beta$ -peptidi vaurioittaa kolesterolin kuljetusmekanismia. Lyhyempi APP:n  $\alpha$ -sekretaasilla pilkkoma tuote,  $A\beta$ 17-40, estää kolesterolin sitoutumista apolipoproteiinin (ApoE) yleisimpiin muotoihin. ApoE on tärkeä lipoproteiini, joka mahdollistaa kolesterolin kuljetusta solusta ulos.  $A\beta$ 17-40 peptidillä ei ole vaikutusta solun sisään kolesterolia kuljettavaan proteiiniin, LDL:een. ApoE:n ja kolesterolin välillä on heikentynyt vuorovaikutus, kun kuljetus solun sisään pysyy samalla tasolla. Tämä voi johtaa kolesterolin kertymiseen, mikä on sopusoinnussa aikaisemmin mainittujen hypoteesien ja tutkimusten tulosten kanssa. Kuitenkin sitä voi havainnoida vain silloin, kun kolesterolin pitoisuus aivoissa on vielä alhaista. Toisin sanoen, tämä mekanismi voi olla tärkeässä roolissa taudin varhaisessa vaiheessa. Myöhemmin, kun kolesterolia kertyy enemmän, kertyy myös AD:n biomarkkeria,  $A\beta$  1-40 peptidiä. Tämä tapahtuu, muun muassa, koska ylimääräinen kolesterolia sitoutuu APP-molekyylin  $\alpha$ -sekretaasin pilkkomiskohteeseen, mikä edesauttaa APP:n pilkkomista  $\beta$ -sekretaasilla. Pilkkominen  $\alpha$ -sekretaasilla tuottaa liukoisia fragmentteja, kun pilkkominen  $\beta$ -sekretaasilla tuottaa kertymiä muodostuvia peptidejä (Yao & Papadopoulos 2002). Toinen reitti, minkä kautta hyperkolesterolemia tukee  $A\beta$ 1-40 peptidin muodostumista, liittyy siihen, että kolesterolia on tärkein lipidilautojen rakenteellinen yksikkö. Sen kohonnut



pitoisuus tekee lipidilautoista stabiilimpia. Usein lipidilautoissa sijaitseva BACE ( $\beta$ -sekretaasi) stabiloituu laudan sisällä APP proteiinin läheisyydessä. Seurauksena APP:n pilkkominen ja plakkia muodostuvien peptidien tuotanto helpottuu. Kolesterolipuute päinvastoin vähentää APP:n pilkkomista BACE:lla (Ehehalt *et.al.* 2003).

Hyperkolesterolemian seurauksena muodostuva pidempi A $\beta$ -peptidi(1-40) estää kolesterolin vuorovaikutusta LDL-kuljetusmolekyylin kanssa, joten solun sisään pääsee vähemmän kolesterolia ja sen pitoisuus ei enää kasva myöhäisessä AD:ssa (Yao & Papadopoulos 2002). Myös kolesterolin pitoisuuden kasvun pysähtyminen voi liittyä sen hapettumiseen.

Sen takia, että amyloidien muodostuminen ja kolesterolin hapettaminen ovat toisiaan avustavia prosesseja, seuraavaksi käsitellään sitä, miten oksisterolit lisäävät amyloidien määrää ja neurotoksisuutta.

7 $\beta$ -OH-kolesteroli estää liukoisen, eli ei amyloidogeenisen, APP:n eritystä ja inhiboi tuumorinekroositekijän- $\alpha$ -muuntavan entsyymin (TACE), joka on luonteeltaan  $\alpha$ -sekretaasi. Sen takia, että  $\alpha$ -sekretaasit pilkkovat  $\beta$ -amyloidin sekvenssin sisällä, niiden toimita estää  $\beta$ -amyloidien kertymistä ja lisää liukenevan APP:n fragmentin eritystä. TACE:n aktiivisuuden lasku vähentää näin liukenevan muodon erittymistä. Toisessa kohdassa APP:ta leikkavaan entyymiin eli BACE:hen 7 $\beta$ -OH-kolesterolilla ei ole mitään vaikutusta, joten amyloidogeenisten fragmenttien erityks pysyy samalla tasolla tai jopa kasvaa  $\alpha$ -sekretaasin toimettomuuden seurauksena. APP:n erityks on tärkeää neuronien elongaation ja adheesion kannalta, sen takia 7 $\beta$ -OH-kolesterolikäsittely myös voi aiheuttaa solujen ulkomuodon ja synapsikontaktien menettämistä. Sen lisäksi 7 $\beta$ -OH-kolesteroli inhiboi proteiinikinaasin C (PKC) yleisimpiä isomuotoja  $\alpha$ - ja  $\gamma$ -PKC (Nelson & Alkon 2005).

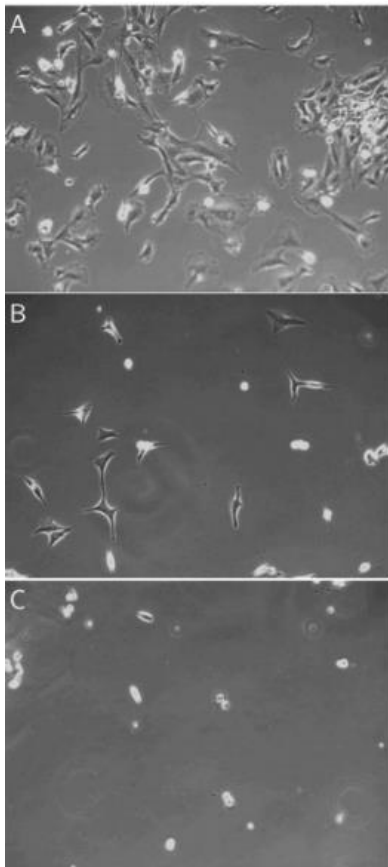
Kolesterolioksidation tuotteilla todistettiin neurotoksisten aggregaattien muodostumista tehostavaa vaikutusta *in vivo*. Oksidaatioreaktion seurauksena kolesterolin rakenteeseen voi muodostua aldehydyryhmä. Reaktion tuotetta kutsutaan aldehydikolesteroliksi ja se pystyy sitoutumaan aminohappoihin HNE:n tapaan. Se, mihin kohtaan aldehydikolesteroli sitoutuu määrittää proteiinien alttiutta muodostaa aggregaatteja. Kun tutkittiin A $\beta$ -aldehydikolesteroli-konjugaatteja, joissa kolesteroli oli sitoutunut Asp-1, Lys tai Lys-28 aminohappoon, huomattiin että erityisen tehokkaasti A $\beta$ -proteiinin aggregoitumisalttiutta lisää Lys16 aminohapon modifikaatio. Se mahdollistaa proteiinien aggregoitumista vaikka niiden

pitoisuus olisi alhaista. Yllä mainitusta heikoin vaikutus on Asp-1 modifikaatiolla (Usui *et.al.* 2009).

### **3.5. Oksikolesterolien vaikutus soluun**

Eritrosyyteillä tutkittiin oksisterolien vaikutusta ja havainnoitiin, että ne aiheuttavat apoptoosia, jota edeltävät solujen kutistuminen ja membraanilipidin, fosfatidylseriinin, eksternalisaatio (Tesoriere *et.al.* 2014). Vaikka veri- ja hermokudoksen solut eroavat toisistaan, HNE:n esimerkillä nähtiin, että patologiset muutokset usein toistuvat eri sairauksissa, jos niillä on yhteinen tausta. Eritrosyyttien kaltaiset morfologiset muutokset hermosoluissa voivat vaikuttaa synapseihin negatiivisesti. Kuten oli jo aikaisemmin mainittu, solumuodon menettämisen seurauksena solu-solu kontaktia menetetään.

7 $\beta$ -OH-kolesteroli on yksi kahdesta oksisterolista, joiden pitoisuus kasvaa merkittävästi jo varhaisessa AD:ssa. Seurauksena sen vaikutus on erittäin tärkeää tuntea, jos halutaan estää ensimmäisiä potilaiden aivoissa tapahtuvia muutoksia. 7 $\beta$ -hydroksikolesterolin neurotoksinen luonne oli todistettu *in vivo*. 7 $\beta$ -OH-kolesterolikäsittely edesauttaa apoptoosia ja solun muodon menettämistä, samalla kuin yllä mainituissa eritrosyyteissä, mikä on hyvin näkyvissä kuvalla 6. Noin 50% soluista kävi apoptoosia 100  $\mu$ M 7 $\beta$ -OH käsittelyn jälkeen. Se todistaa, että hermosolut ovat erittäin herkkiä oksisterolikäsittelylle, koska aikaisemmissa tutkimuksissa muilla solulinjoilla vaadittiin korkeampaa konsentraatiota (Nelson & Alkon 2005).



Kuva 6. Hermosolut  $7\beta$ -OH-kolesterolikäsittelyn jälkeen. A. Ei-käsittelyä. B. 300 nM  $7\beta$ -OH-kolesterolia. C. 1  $\mu$ M  $7\beta$ -OH-kolesterolia. (Nelson) Kuvassa näkyy, että alhaisella oksisterolin pitoisuudella solut menettävät muotoansa ja solu-solukontakteja. Sen lisäksi solumäärä vähenee solukuoleman seurauksena. Muutokset ovat valtavampi, kun oksisterolin pitoisuus on suurempi, kaikki solut menettävät muotonsa Kuvan lähde: Nelson & Alkon 2005. Oxidation of cholesterol by amyloid precursor protein and  $\beta$ -amyloid peptide © JBC

Oksisterolit luovat OS:ia soluissa, mikä on vakavampaa, kuin ROS:ien aiheuttama stressi. Se johtuu siitä, että ROS:ien detoksifikaatiolle on olemassa nopeita mekanismeja ja entsyymejä, kun lipofiiliset oksikolisterolit kertyvät ja niiden kontribuutio OS:iin kasvaa taudin etenemisen mukaisesti (Nelson & Alkon 2005).

Apoptoosin lisäksi vaihtoehtona solukuolemalle voi olla nekroosi. Apoptoosi on ATP-riippuvainen prosessi, ja ATP:n puute, esimerkiksi häiriintyneen glukoosiaineenvaihdunnan seurauksena, johtaa siihen, että apoptoosin sijaan tapahtuu nekroosia. Sitä todisti Leist tutkimuksessaan, missä inhiboitiin ATP synteesiä natriumoksidilla ja solut kuolivat nekroosilla (Leist *et.al.* 1999).

Hermosolut tarvitsevat paljon energiaa toimintaansa. Tämän seurauksena ne käyttävät paljon glukoosia ja muita energialähteitä ja niiden energiavaihduntamekanismit toimivat aina tehokkaasti. Sen takia pienilläkin vaurioilla voi olla välitön ja erittäin nopea negatiivinen vaikutus. Toisin sanoen, hermosoluilla ei ole aikaa reagoimaan vaurioon, koska energiaa tarvitaan jatkuvasti vain lisää. Kolesterolin oksidaatiotuotteet vaikuttavat glukoosiaineenvaihduntaan hermosoluissa. Se on yksi monesta tekijöistä, jotka edesauttavat neuronien apoptoosia tai nekroosia puutteellisen ravinnon seurauksena. 27-OH-kolesteroli muodostaa merkittävimmän yhteyden glukoosin ja kolesterolin aineenvaihdunta-reittien välillä. 27-OH-kolesterolin ylimäärä vähentää glukoosiottoa hermosoluissa (Ismail *et.al.* 2017), minkä seurauksena ATP:n määrä laskee ja nekroosin todennäköisyys kasvaa. Brooks ja hänen ryhmänsä tutkimuksessa (2017) todistettiin 27-OH-kolesterolin yhteyttä neurodegeneraatioon FluoroJade C menetelmällä. Toisin sanoen, havainnoitiin, että 27-OH-kolesterolin kertyminen korreloi hermostorapautumisen kanssa.

Yhdistämällä yllä mainittuja tutkimuksia voi sanoa, että oksikolesteroleilla on pro-apoptoottinen vaikutus hermosoluihin. Oksikolesterolien korkea pitoisuus voi johtaa patologiaan morfologiamuutoksiin, kuten elongaation ja solu-solukontaktien menettämiseen.

#### **4. Mitokondrion toimintahäiriöt lipidien peroksidaation seurauksena ja niiden yhteys apoptoosiin**

Mitokondrio on erittäin tärkeä soluelin paljon energiaa tarvitsevalle kudokselle. AD:n potilaiden aivojen hippokampuksessa tapahtui mitokondriomäärän laskua (Brooks *et.al.* 2017), mikä voi olla syynä häiriintyneelle glukoosiaineenvaihdunnalle ja energian puutteesta johtuvaan solukuolemaan AD potilaiden aivoissa.

Lipidien peroksidaatiollakin oli havainnoitu yhteys mitokondrion vajaatoimintaan.

Esimerkiksi Kölschin tutkimuksessa todistettiin, että 24-OH-kolesterolin käsittelystä johtuvat apoptoosia edeltävät muutokset mitokondrion membraanipotentiaalissa. Membraanipotentiaali on huomattavasti depolarisoitunut hidastaen ATP synteesin toimintaa (Kölsch *et.al.* 2001). Tämä muutos häiritsee muun muassa mitokondriokuljetusta ja energia-aineenvaihduntaa. Kuitenkin tämä muutos voi olla merkityksetön myöhäisessä AD:ssa, 24-OH-kolesterolin alhaisen pitoisuuden takia.

HNE:n käsittelyn aiheuttama solujen alttiut kuolemalle oli todistettu kokeellisesti neurologisen, PC12, solulinjan esimerkillä (Siddiqui *et.al.* 2012). HNE toimii samalla mekanismilla kuin sen trans-isomeeri 4-ONE ja molemmat johtavat glutationin eli elimistön tärkeimmän antioksidanttimolekyylin pitoisuuden laskuun, mitokondrion kutistumiseen ja mitokondrialisten proteiinien aldehydidehydrogenaasin ALDH2 ja ALDH5A inhibitioon (Picklo *et.al.* 2011). Mitokondrion kutistuminen on morfologinen muutos, mikä tapahtuu yleensä solukuoleman yhteydessä (Kerr *et.al.* 1972). ALDH2 entsyymin inhibitio puolestaan heikentää solun oksidatiiviseen stressin torjuntakykyä, koska mitokondriaalinen entsyymi ALDH pelkistää reaktiivista aldehydiä. Reaktiivinen aldehydi syntyy muun muassa lipidien peroksidaation seurauksena. Erässä tutkimuksessa seurattiin, kuinka ALDH2:n aktivaatio vaikuttaa proteiinipooliin ApoE-proteiinivajoissa hiirissä. Tutkittavien hiirien mitokondrioproteiinien ekspresio erottuu terveistä yksilöistä ja seurauksena niiden energia-aineenvaihdunta, neuroplastisuus ja neurogeneesi ovat häiriintyneitä. ALDH2:n aktivaatio on vaikuttanut positiivisesti mitokondriaaliseen funktioon ApoE-proteiinivajaaissa hiirissä (Stachowicz *et.al.* 2017). Näin tutkimuksessa todistettiin ALDH2:n merkitystä mitokondrion toiminnalle. ALDH2:n tärkeää roolia korostaa myös se, että ALDH2-geenin mutaatioita omistavat hiirisolut olivat paljon terveitä herkempiä HNE käsittelylle. Villityyppisolut pystyvät tehokkaasti vastustamaan HNE:n toksisuutta ALDH2-entsyymin avulla (Ohsawa *et.al.* 2003). Myös meta-analyysit korostavat ALDH2 geenipolymorfismin vaikutusta AD alttiuteen. Vaikka löydetty vaikutus on tilastollisesti merkityksellinen vain miehille, koko aineiston perusteella löytyy kohtuullisen voimakas korrelaatio ALDH2 mutaatioiden ja AD-alttiuden välillä (Hao *et.al.* 2011). Kun hapetettujen molekyylien määrä kasvaa OS:n seurauksena aivot pyrkivät eliminoimaan niitä, mikä näkyy anti-oksidatiivisten entsyymien, mukaan lukien ALDH2, aktiivisuuden nousuna (Michel *et.al.* 2010) ALDH2 inaktivaatio HNE:n kertymisen seurauksena heikentää solua, häiritsee mitokondrion toimintaa ja mahdollistaa nopeampaa OS:n paineen lisäämistä ja taudin edistymistä.

Membranin kutistuminen ja muut patologiset muutokset mitokondrion toiminnassa, johtavat sytokromi c:n vapauttamiseen mitokondriosta solulimaan (Heiskanen *et.al.* 1999). Vapaana sytokromi c muodostaa kompleksin kaspasi-9 proteiinin kanssa ja käynnistää kaspasikaskaadin. Kaspasikaskadi on luonteeltaan apoptoottinen. Kaspasit ovat proteolyttisiä entsyymiä, jotka pilkkovat intrasellulaarisia proteiineja.

Seuraavaksi solu “näyttää” pilkkoneiden proteiinien paloja solun ulkomembraanilla, mikä indusoi solun poistamista fagocytoosin välityksellä (Martin 2014). Samalla sytokromi c:n vapauttaminen mitokondriosta lisää OS:iä solulle, koska normaalia mitokondriossa tapahtuvaa 4-elektroni pelkistystä korvataan 1-elektronipelkistyksellä solulimassa. Tämä vaihtoehtoinen reaktio tuottaa ROS:ia, jotka puolestaan lisäävät lipidien peroksidaatiota (Cai & Jones 1998).

Mitokondrion toimintahäiriöt johtavat solun kuolemaan muutamien reaktioreittien välityksellä. Mitokondrion vajaatoiminta voi olla yhtenä syynä AD:n edistymiseen. Muutoksia tapahtuu ikääntyessä mitokondrion energia-aineenvaihdunnan geenieskpressiossa jo silloin, kuin muita biomarkkereita ei ole havaittavissa (Zhao *et.al.* 2015).

## **5. Oksidatiiviseen stressiin keskittyvän hoidon tehokkuus ja tulevaisuus**

Vanhempien potilaiden AD eroaa nuoremmista sillä, että taudissa ei havainnoida yleisiä biomarkkereita tai niiden pitoisuudet ovat kohtalaisia. Sitä huolimatta vanhemmilla potilailla alkaa ilmestymään kohotettu HNE-konjugaattien pitoisuus, mikä on merkki siitä, että vakava OS on olemassa ja se vahingoittaa solun tärkeimpiä toimintoja. Se, että tauti edistyy, vaikka proteiinikertymiä eli amyloideja ja NFT ei ilmestykään kovin paljon, tarkoittaa sitä, että AD:n taustalla voi tapahtua muita tärkeitä aineenvaihduntamuutoksia (Zhao *et.al.* 2015).

Nykyään AD:lle ei ole tehokasta hoitokeinoa ja kaikki tutkitavat lääkitykset esittävät kyseenalaisia haitta-hyötysuhteita. Yleensä hoitokeinot kohdistuvat amyloideihin ja NFT:hen. Muut aineenvaihduntamuutokset ja muiden biomolekyylien kertymät jäävät huomioimatta. Passiivinen immunisaatio on useimmin tutkittu hoitokeino. Esimerkkinä voi mainita kaksi toimivaa vasta-ainetta - Anti- $\beta$ -amyloidi-vasta-aine, solanezumab, ja tau-vasta-aine. Nämä vasta-aineet poistavat niille spesifisiä kertymiä hyvin ja hiirimallilla havainnoitiin myös taudin etenemisen hidastumista niiden ansiosta (Chai *et.al.* 2011, Farlow *et.al.* 2012). Mutta kummastakaan ei vielä tullut hyväksyttyä toimivaa lääkitystä.

Nykyaikainen stagnaatio AD hoidon kehityksessä aiheuttaa muutoksia tutkimustrendeissä. Vuonna 2020 tau-proteiiniteoria, eli ajatus siitä, että hermosäikekimppejen muodostuminen on pääroolipelaaja AD:n edistymisessä erityisesti lievässä/kohtalaisessa taudin vaiheessa, voi olla

todistettu todeksi tai suurin osa yrityksistä luovuttaa kokonaan sen suhteen. Jo nykyään AD tutkimukset pyrkivät keskittymään uusiin kohteisiin ja löytämään innovatiivisia, ennen mainitsemattomia keinoja hoitaa AD potilaita. Uutena kohteena voisivat olla OS:n tuotteet.

Esimerkiksi AD:ssa tapahtuvia solukalvoproteiinien ja solukalvon ominaisuuksien muutoksia oli mahdollista estää tehokkaasti lisäämällä glutationietyyliesteriä. Mallina käytettiin hiiren synapsisia solukalvoja, mitkä vaurioituvat merkittävästi AD:ssa. Glutatioonietyyliesteri on yksi tehokkaimmista elimistön antioksidanteista. Todistettu glutationietyyliesterin tehokkuus tukee ajatusta, että OS ja sen tuotteet ovat tärkeitä tekijöitä taudin etenemisen kannalta (Subramaniam *et.al.* 2002).

Kvantitatiivisten systeemien farmakologian malli (QSP) ennustaa potentiaalisia hoitokohteita hoitamattomille taudeille kuten AD:lle. Mallin mukaan jo tunnettujen biomarkkereiden ohella, hoito tulee keskittymään lipidien, tarkemmin sfingolipidien, aineenvaihduntaan. Samalla tärkeäksi oletetaan kolesterolin aineenvaihduntaa. Hoidon tehokkuus erään sfingolipidi-aineenvaihduntaentsyymin antagonistilla oli jo todistettu hiireillä (Clausznitzner *et.al.* 2018).

AD on sairaus, jossa lähes kaikki solun toiminnot häiriintyvät ja aivoihin kertyy paljon haitallisia aineita. Proteiinikertymiin kohdistuva hoito voisi olla tehokkaampaa, jos se olisi yhdistetty HNE:n, oksisterolien ja muiden lipidien peroksidaation tuotteiden poistamiseen.

Kuten oli tässä todistettu, kaikki prosessit riippuvat toisistaan ja lipidien peroksidaation tuotteet käynnistävät proteiinien aggregoitumista ja lisäävät OS:n painetta. Yleensä OS:n tekijöiksi ajatellaan vain ROS:ia unohtaen karbonyylistressin merkitystä. Tosiasiassa monien lipidiperoksidaation tuotteiden pitoisuudet myös nousevat taudin edistyessä ja lisäävät karbonyylistressiä solussa. Karbonyyliyhdisteiden aktiivisuus voi olla ROS:ia haitallisempi, koska elimistöllä ei ole nopeita keinoja niiden poistoon. Kokonaisvaltaisempi katsaus solun aineenvaihduntaan ja lipidiaineenvaihdunnan huomioonotto voivat olla toimivan tulevaisuuden lääkityksen kehityksen pohjana.

## 6. Lähteet:

1. Amemori T, Jendelova P, Ruzicka J, Machova Urdzikova L, Sykova E. Alzheimer's disease: Mechanism and approach to cell therapy. *Int J Mol Sci.* 2015;16(11):26417-26451.

2. Barupal, DK, Baillie R, Fan S, Saykin AJ, Meikle PJ, Arnold M, Nho K, Fiehn O, Kaddurah-Daouk R. Sets of coregulated serum lipids are associated with Alzheimer's disease pathophysiology. *Alzheimer's and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring* 2019;11:619-627.
3. Björkhem I, Cedazo-Minguez A, Leoni V, Meaney S. Oxysterols and neurodegenerative diseases. *Mol Aspects Med.* 2009;30(3):171-179.
4. Brooks SW, Dykes AC, Schreurs BG. A high-cholesterol diet increases 27-hydroxycholesterol and modifies estrogen receptor expression and neurodegeneration in rabbit hippocampus. *Journal of Alzheimer's Disease* 2017; 56(1):185 – 196.
5. Butterfield DA, Hensley K, Harris M, Mattson M, Carney J. B-amyloid peptide free radical fragments initiate synaptosomal lipoperoxidation in a sequence-specific fashion: Implications to Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1994;200(2):710-715.
6. Cai J, Jones DP. Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273(19):11401 – 11404.
7. Cenini G, Sultana R, Memo M, Butterfield DA. Effects of oxidative and nitrosative stress in brain on p53 proapoptotic protein in amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine* 2008;45(1):81 – 85.
8. Chai X, Wu S, Murray TK, Kinley R, Cella CV, Sims H, Buckner N, Hanmer J, Davies P, O'Neill MJ, Hutton ML, Citron M. Passive immunization with anti-tau antibodies in two transgenic models. *J Biol Chem.* 2011;286(39):34457-34467.
9. Clausznitzer D, Pichardo-Almaraz C, Relo AL, van Bergeijk J, van der Kam E, Laplanche L, Benson N, Nijsen M. Quantitative systems pharmacology model for Alzheimer disease indicates targeting sphingolipid dysregulation as potential treatment option. *CPT: Pharmacometrics and System Pharmacology* 2018;7(11):759 – 770.
10. Ehehalt R, Patrick Keller, Christian Haass, Christoph Thiele, Kai Simons. Amyloidogenic processing of the Alzheimer  $\beta$ -amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *The Journal of Cell Biology.* 2003;160(1):113-123.



11. Farlow M, Arnold SE, van Dyck CH, Aisen PS, Snider BJ, Porsteinsson AP, Friedrich S, Dean RA, Gonzales C, Sethuraman G, DeMattos RB, Mohs R, Paul SM, Siemers ER. Safety and biomarker effects of solanezumab in patients with Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2012;8(4):261-271.
12. Guo J, Prokai-Tatrai K, Ngyuen V, Rauniyar N, Ughy B, Prokai L. Protein targets for carbonylation by 4-hydroxy-2-nonenal in rat liver mitochondria. *J Proteomics.* 2011;74(11):2370-2379.
13. Hao P, Chen Y, Wang J, Wang XL, Zhang Y. Meta-analysis of aldehyde dehydrogenase 2 gene polymorphism and Alzheimer's disease in east asians. *Can J Neurol Sci.* 2011;38(3):500-506.
14. Heiskanen KM, Bhat MB, Wang HW, Ma J, Nieminen AL. Mitochondrial depolarization accompanies cytochrome c release during apoptosis in PC6 cells. *Journal of Biological Chemistry* 1999;274(9):5654 – 5658.
15. Heverin M, Bogdanovic N, Lütjohann D, Bayer T, Pikuleva I, Bretillon L, Diczfalusy U, Winblad B, Björkhem I. Changes in the levels of cerebral and extracerebral sterols in the brain of patients with Alzheimer's disease. *Journal of Lipid Research* 2004;45(1):186 – 193.
16. Huang X, Atwood CS, Hartshorn MA, Multhaup G, Goldstein LE, Scarpa RC, Cuajungco MP, Gray DN, Lim J, Moir RD, Tanzi RE, Bush AI. The A beta peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry.* 1999;38(24):7609-7616.
17. Ismail MAM, Mateos L, Maioli S, Merino-Serrais P, Ali Z, Lodeiro M, Westman E, Leitersdorf E, Gulyás B, Olof-Wahlund L, Winblad B, Savitcheva I, Björkhem I, Cedazo-Mínguez A. 27-hydroxycholesterol impairs neuronal glucose uptake through an IRAP/GLUT4 system dysregulation. *J Exp Med.* 2017;214(3):699-717.
18. Jansen WJ, Ossenkoppele R, Knol DL, Tijims BM, Scheltens P, Verhey FRJ, Visser PJ. Prevalence of cerebral amyloid pathology in persons without dementia. *JAMA.* 2015;313(19):1924-1938.

19. Jin J, Zheng Y, Brash AR. Demonstration of HNE-related aldehyde formation via lipoxygenase-catalyzed synthesis of a bis-allylic dihydroperoxide intermediate. *Chem Res Toxicol*. 2013;26(6):896-903.
20. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239-257.
21. Kim J, Basak JM, Holtzman DM. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*. 2009;63(3):287-303.
22. Kölsch H, Ludwig M, Lütjohann D, Rao ML. Neurotoxicity of 24-hydroxycholesterol, an important cholesterol elimination product of the brain, may be prevented by vitamin E and estradiol-17 $\beta$ . *Journal of Neural Transmission* 2001;108(4):475 – 488.
23. Leist M, Single B, Naumann H, Fava E, Simon B, Kühnle S, Nicotera P. Inhibition of mitochondrial ATP generation by nitric oxide switches apoptosis to necrosis. *Experimental Cell Research*. 1999;249(2):396-403.
24. Lin YT, Seo J, Gao F, Feldman HM, Wen HL, Penney J, Cam HP, Gjoneska E, Raja WK, Cheng J, Rueda R, Kritskiy O, Abdurrob F, Peng Z, Milo B, Yu CJ, Elmsaouri S, Dey D, Ko T, Yankner BA, Tsai LH. APOE4 causes widespread molecular and cellular alterations associated with Alzheimer's disease phenotypes in human iPSC-derived brain cell types. *Neuron* 2018;98(6):1141 – 1154.
25. Liu Q, An Y, Ma W, Feng L, Wang C, Lu Y, Xiao R. High-cholesterol diet results in elevated amyloid- $\beta$  and oxysterols in rats. *Molecular Medicine Reports* 2018;17(1):1235 – 1240.
26. Magrané J, Smith RC, Walsh K, Querfurth HW. Heat shock protein 70 participates in the neuroprotective response to intracellularly expressed b-amyloid in neurons. *Journal of Neuroscience* 2004;24(7):1700 – 1706.
27. Montine KS, Olson SJ, Amarnath V, Whetsell WO, Graham DG, Montine TJ. Immunohistochemical detection of 4-hydroxy-2-nonenal adducts in Alzheimer's disease is associated with inheritance of APOE4. *Am J Pathol*. 1997;150(2):437-443.
28. Murray RK, Bender DA, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. *Harper's illustrated biochemistry* 2006;28:123 – 126.

29. Murray IVJ, Liu L, Komatsu H, Uryu K, Xiao G, Lawson JA, Axelsen PH. Membrane-mediated amyloidogenesis and the promotion of oxidative lipid damage by amyloid  $\beta$  proteins. *J Biol Chem*. 2007;282(13):9335-9345.
30. Martin SJ. Caspases: Executioners of apoptosis. *Pathobiology of human disease: A dynamic encyclopedia of disease mechanisms* 2014:145 – 152.
31. Michel TM, Gsell W, Käsbauer L, Tatschner T, Sheldrick AJ, Neuner I, Schneider F, Grünblatt E, Riederer P. Increased activity of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH) in the putamen of individuals with Alzheimer's disease: A human postmortem study. *Journal of Alzheimer's Disease* 2010;19(4):1295 – 1301.
32. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. 4-Hydroxynonenal, CID=5283344 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5283344>. Accessed Jan 29, 2020.
33. Neely MD, Sidell KR, Graham DG, Montine TJ. The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal inhibits neurite outgrowth, disrupts neuronal microtubules, and modifies cellular tubulin. *Journal of Neurochemistry*. 1999;72(6):2323-2333.
34. Nelson TJ, Alkon DL. Oxidation of cholesterol by amyloid precursor protein and  $\beta$ -amyloid peptide. *JBC* 2005;280:7377 – 7387.
35. Newton BW, Russell WK, Russell DH, Ramaiah S, Jayaraman A. Liver proteome analysis in a rodent model of alcoholic steatosis. *J Proteome Res*. 2009;8(4):1663-1671.
36. Nguyen E, Picklo Sr. MJ. Inhibition of succinic semialdehyde dehydrogenase activity by alkenal products of lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease* 2003;1637(1):107 – 112.
37. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;338(1):668-676.
38. Ohsawa I, Nishimaki K, Yasuda C, Kamino K, Ohta S. Deficiency in a mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases vulnerability to oxidative stress in PC12 cells. *J Neurochem*. 2003;84(5):1110-1117.

39. Peila R, Rodriguez BL, Launer LJ. Type 2 diabetes, APOE gene, and the risk for dementia and related pathologies: The Honolulu-Asia aging study. *Diabetes* 2002;51(4):1256 – 1262.
40. Perluigi M, Sultana R, Cenini G, et al. Redox proteomics identification of 4-hydroxynonenal-modified brain proteins in Alzheimer's disease: Role of lipid peroxidation in Alzheimer's disease pathogenesis. *Proteomics Clin Appl*. 2009;3(6):682-693.
41. Picklo MJ, Azenkeng A, Hoffman MR. Trans-4-oxo-2-nonenal potently alters mitochondrial function. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011;50(2):400-407.
42. Prasad MR, Lovell MA, Yatin M, Harbhajan D, Markesbery WR. Regional membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. *Neurochemical Research* 1998;23:81 – 88.
43. Puglielli L, Friedlich AL, Setchell KDR, Nagano S, Opazo C, Cherny RA, Barnham KJ, Wade JD, Meloy S, Kovacs DM, Bush AI. Alzheimer disease  $\beta$ -amyloid activity mimics cholesterol oxidase. *J Clin Invest*. 2005;115(9):2556-2563.
44. Reed T, Perluigi M, Sultana R, Pierce WM, Klein JB, Turner DM, Coccia R, Markesbery WR, Butterfield DA. Redox proteomic identification of 4-hydroxy-2-nonenal-modified brain proteins in amnesic mild cognitive impairment: Insight into the role of lipid peroxidation in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*. 2008;30(1):107-120.
45. Sayre LM, Lin D, Yuan Q, Zhu X, Tang X. Protein adducts generated from products of lipid oxidation: Focus on HNE and ONE. *Drug Metab Rev*. 2006;38(4):651-675.
46. Schoentgen F, Jollès P. From structure to function: Possible biological roles of a new widespread protein family binding hydrophobic ligands and displaying a nucleotide binding site. *FEBS Lett*. 1995;369(1):22-26.
47. Siddiqui MA, Kumar V, Kashyap MP, Agarwal M, Singh AK, Khanna VK, Al-Khedhairi AA, Musarrat J, Pant AB, Jahan S. Short-term exposure of 4-hydroxynonenal induces mitochondria-mediated apoptosis in PC12 cells. *Human and Experimental Toxicology* 2012;31(4):336 – 345.
48. Stachowicz A, Olszanecki R, Suski M, Głombik K, Basta-Kaim A, Adame D, Korbut R. Proteomic analysis of mitochondria-enriched fraction isolated from the frontal cortex and

- hippocampus of apolipoprotein e knockout mice treated with alda-1, an activator of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2). *International Journal of Molecular Sciences* 2017;18(2).
49. Subramaniam R, Roediger F, Jordan B, Mattson MP, Keller JN, Waeg G, Butterfield DA. The lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-trans-nonenal, alters the conformation of cortical synaptosomal membrane proteins. *Journal of Neurochemistry*. 2002;69(3):1161-1169.
  50. Tesoriere L, Attanzio A, Allegra M, Cilla A, Gentile C, Livrea MA. Oxysterol mixture in hypercholesterolemia-relevant proportion causes oxidative stress-dependent eryptosis. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2014;34(4):1075 – 1089.
  51. Testa G, Staurengi E, Zerbinati C, Garguilo S, Iuliano L, Giaccone G, Fantó F, Poli G, Leonarduzzi G, Gamba P. Changes in brain oxysterols at different stages of Alzheimer's disease: Their involvement in neuroinflammation. *Redox Biology*. 2016;10(C):24-33.
  52. Tilastokeskus. Kuolemansyyt 2018. [https://tilastokeskus.fi/tup/suoluk/suoluk\\_terveys.html](https://tilastokeskus.fi/tup/suoluk/suoluk_terveys.html). Accessed Jan 29, 2020.
  53. Usui K, Hulleman JD, Paulsson JF, Siegel SJ, Powers ET, Kelly JW. Site-specific modification of Alzheimer's peptides by cholesterol oxidation products enhances aggregation energetics and neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America* 2009;106(44):18563 – 18568.
  54. Vaya J, Song W, Khatib S, Geng G, Schipper HM. Effects of heme oxygenase-1 expression on sterol homeostasis in rat astroglia. *Free Radical Biology and Medicine*. 2007;42(6):864-871.
  55. WHO. The top 10 causes of death. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. Accessed Jan 29, 2020.
  56. Zarkovic K, Juric G, Waeg G, Kolenc D, Zarkovic N. Immunohistochemical appearance of HNE-protein conjugates in human astrocytomas. *Biofactors*. 2005;24(1-4):33-40.
  57. Zhao W, Wang J, Varghese M, Ho L, Mazzola P, Haroutunian V, Katsel PL, Gibson GE, Levine S, Dubner L, Pasinetti GM. Impaired mitochondrial energy metabolism as a novel risk

factor for selective onset and progression of dementia in oldest-old subjects. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 2015;11:565 – 574.

58. Yao ZX, Papadopoulos V. Function of  $\beta$ -amyloid in cholesterol transport: A lead to neurotoxicity. *FASEB Journal* 2002;16(12).